

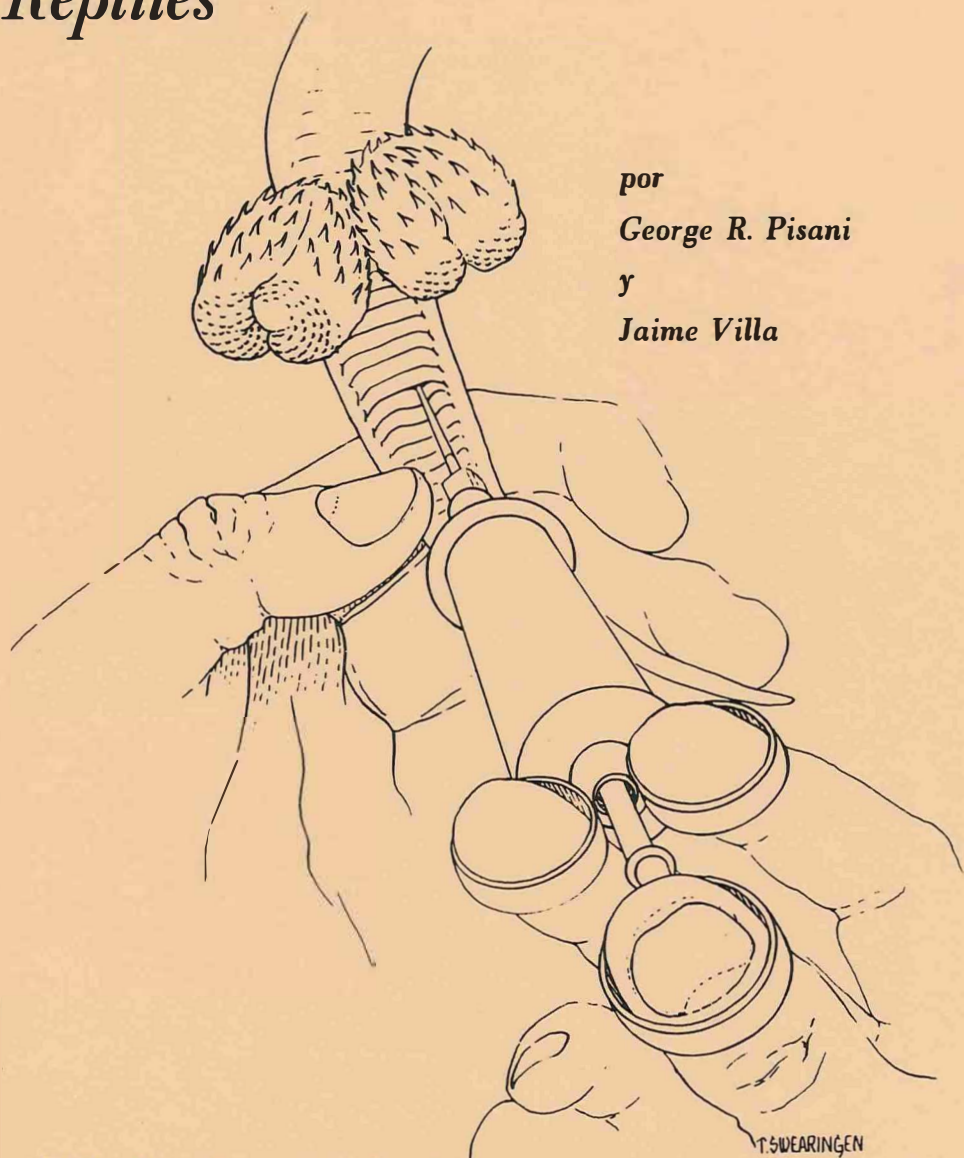
Guia de Tecnicas de Preservacion de Anfibios y Reptiles

por

George R. Pisani

y

Jaime Villa



published by the society for the study of amphibians and reptiles

NOTA DEL EDITOR

Este es el segundo número de una nueva serie de Publicaciones Misceláneas tituladas "Circulares Herpetológicas", diseñada para proporcionar información básica para el herpetólogo aficionado o principiante. Será de utilidad para museos, zoológicos y laboratorios, al responder preguntas sobre: mantenimiento de colecciones, información necesaria que debe registrarse en las notas de campo, cómo enviar los especímenes, preservación del color, etc. Los nombres y marcas comerciales de reactivos, papel, fijadores, y las direcciones de las casas que los suplen, se citan cuando ha parecido necesario.

La edición Española es esencialmente idéntica a la Inglesa, modificada según las necesidades propias de los países de habla Española.

Copias sueltas de este folleto pueden obtenerse a razón de US \$ 0.35 cada una (y US \$ 0.20 c/u en pedidos de 25 o mas), porte incluido. Los pedidos deben dirigirse al Dr. Henri C. Seibert, Department of Zoology, Morton Hall, Ohio University, Athens, Ohio 45701 (U. S. A.)

* * *

Publicado en 1974 por la
SOCIETY FOR THE STUDY OF AMPHIBIANS AND REPTILES
(Sociedad para el Estudio de Anfibios y Reptiles)

MISCELLANEOUS PUBLICATIONS
(Publicaciones Misceláneas)
Circular Herpetológica No.2
Stephen R. Edwards, Editor

* * *

University of Kansas, Lawrence, Kansas 66044 (U. S. A.)

Una lista de otras publicaciones de la Sociedad, incluyendo las de The Ohio Herpetological Society (Sociedad Herpetológica de Ohio), Facsimile Reprints in Herpetology (Reimpresiones Facsímiles de Herpetología), Herpetological Review (Revisión Herpetológica) y el Catalogue of American Amphibians and Reptiles (Catálogo de Anfibios y Reptiles Americanos) se enviará gratis al solicitarse al Secretario de Publicaciones, Dr. Henri C. Seibert, Department of Zoology, Morton Hall, Ohio University, Athens, Ohio 45701 (U. S. A.)

Los miembros de la Sociedad reciben una subscripción a la serie de Circulares, Reimpresiones Facsímiles, la revista técnica de la Sociedad (Journal of Herpetology), y Herpetological Review. Actualmente las cuotas son US \$8.00 para

(Continúa en la cara interna de la cubierta de atrás.)

GUIA DE TECNICAS DE PRESERVACION DE ANFIBIOS Y REPTILES

por

GEORGE R. PISANI
Department of Biology
The University of Kansas
Lawrence, Kansas 66044

y

JAIME VILLA
Section of Neurobiology and Behavior
Cornell University
Langmuir Laboratory
Ithaca, New York 14850

Ilustraciones

Patricia May y Tom Swearingen
Museum of Natural History
The University of Kansas

Contenido

Introducción	1
Notas de Campo	2
Como matar los Ejemplares	5
Fijación	7
Transporte Interno	14
Transporte Internacional	15
Almacenamiento	18
Preservación del Color	19
Referencias	22
Indice	23

INTRODUCCION

A través de los años han aparecido varios artículos informativos describiendo métodos para preservar anfibios y reptiles, pero en su mayoría han sido de distribución relativamente limitada, ya sea por las instituciones, o por los individuos que los publicaron. Son aún mas escasos los escritos en Español, y éstos generalmente han aparecido como un breve apéndice al final de los pocos libros divulgativos que existen sobre faunas herpetológicas locales. Por esto, y por las nuevas leyes impuestas a jeringas hipodérmicas y a ciertas drogas usadas para matar a los ejemplares, creemos necesario tratar de nuevo el tema. En esta obra tratamos de combinar una revisión completa de las técnicas modernas con un formato que el colector individual pueda facilmente llevar consigo al campo.

En una era en que tantas especies silvestres y areas del entorno o habitat adecuado están al borde del exterminio, vale la pena incluir una súplica conservacionista en este folleto. Muchos museos contienen colecciones con muestras excelentes de anfibios y reptiles (especialmente norteamericanos), en cuyo caso es innecesario coleccionar y preservar material adicional que no aumentará apreciablemente nuestro conocimiento de estas especies. No nos referimos a la obtención de muestras para una colección sinóptica docente en institutos o colegios, o para aspectos particulares de investigación científica, sino a la captura y preservación de animales sólo para formar una colección que nunca tendrá fines científicos o docentes. Existen muchas áreas geográficas, incluso en Norteamérica, donde los anfibios y reptiles son pobremente conocidos. En estas áreas pueden realizarse colecciones que aumentarán substancialmente nuestro conocimiento herpetológico. Quienes deseen saber cuales son estas áreas, o cuales son las especies que están mal representadas en colecciones científicas, pueden consultar a los herpetólogos de universidades, museos, zoológicos, etc., cercanos.

Deseamos agradecer a Woodrow W. Barber, Hobart M. Smith, William E. Duellman, Joseph T. Collins, Kraig Adler, Clarence J. McCoy y George Iannarone por habernos proporcionado materiales o consejos útiles; a Juan A. Rivero por la lectura crítica del manuscrito, a Marsha J. Villa y M. Ligia Galarza por asistencia dactilográfica.

NOTAS DE CAMPO.

Los especímenes sin datos sobre la localidad geográfica donde se coleccionaron son practicamente inútiles a investigadores científicos. Mientras mas información esté disponible para cada ejemplar, por el contrario, mayor será su valor científico. Muchas veces los datos que al hacer la colección parecen triviales, pueden resultar valiosos al combinar toda la información disponible. Para asegurar su integridad y permanencia, estas notas deben escribirse en tinta indeleble (tinta China, tinta India o Pelikan) en solo una cara de cada página. Puesto que la tinta indeleble de muchas marcas se destiñe o se decolora si accidentalmente se derrama alcohol sobre una página, la selección de la marca adecuada debe hacerse cuidadosamente. Es útil llevar una pequeña libreta para tomar apuntes en el sitio mismo de la colección y luego transferir los datos al libro de campo tan pronto como sea posible.

Seguidamente damos una muestra sinóptica de datos que deben incluirse en las notas de campo (la numeración se refiere a la figura 1a.):

1. Localidad- No registre la localidad en relación con establecimientos comerciales. Use ciudades, pueblos o vías de comunicación (carreteras, caminos) que aparezcan en los mapas; determine la distancia con un odómetro de automóvil, si se tiene, o estímelo cuidadosamente en los mapas. Debido a que algunos caminos o vías pueden cambiarse o re-numerarse, es aconsejable referirse a vías indicadas en un atlas o mapa bueno que pueda obtenerse en el futuro. En los Estados Unidos de Norteamérica el American Highway Atlas (Gousha Co., Chicago) es adecuado. En otros países pueden obtenerse buenos mapas locales. Si el area de colección está lejos de vías permanentes o importantes, ésta debe localizarse tan exactamente como sea posible usando mapas topográficos. Estos pueden obtenerse en los Institutos Geográficos o Servicios Geodésicos de los países en cuestión, y en el U.S. Geological Survey en los Estados Unidos de Norteamérica. La elevación de la localidad también debe registrarse cuando sea posible. Si no se tiene un altímetro, puede localizar la referencia de nivel más cercana en un mapa topográfico.
2. Fecha- Escribese siempre el nombre entero del mes, o indíquese éste con un número romano, ya que 6-10-71 puede interpretarse como Junio 10 o Agosto 6.

J. Villa
Dic. 1966

fig. 1a

Columbia: San Andrés: Isla Cerca de "La Gruta"

N. Scott, D. Paulson, J. Villa

19 Diciembre 1966

66359 Cnemidophorus lemniscatus ♂

Dorsalmente con franja verde-esmeralda que parte de la escama rostral y que se oscurece al llegar a la cola. Parte central del vientre (4 filas de escamas anchas) y parte de superficie inferior de los miembros es verde-turquesa. El resto del cuerpo excepto partes superiores de brazos y piernas es azul-prusia brillante, con pequeñas manchas más claras en los flancos. Encontrada trepando a un matorral de 1/2 metro de alto. Temp. aire 34.2°C, rectal 31.2°C, -10 am.

66360 Cnemidophorus lemniscatus ♀

Dorsalmente verde-esmeralda con 8 rayas longitudinales más claras; las 4 rayas centrales separadas por pigmento rojizo oscuro. Flancos y parte oculta de miembros con puntos más claros. Superficies ventrales verde-turquesa, más claro en región central. Encontrada en base de cecotero, Temp. aire 34.0°C, rectal 29.5°C.

fig. 1b

GRP 9000

3. Nombre de el o los colectores presentes.
4. Hora de captura.
5. Temperatura del aire y otras notas climáticas--con frecuencia es útil anotar las características del día; si estaba nublado, o la humedad del aire y otros factores climáticos que precedieron la colección.
6. Especies- Anótese todas las especies obtenidas (si son conocidas), y el número de ejemplares de cada una, así como las especies observadas pero no coleccionadas. Apuntes detallados sobre la coloración de los individuos obtenidos pueden luego ser valiosos, especialmente si se toman en sitios cuya herpetofauna es pobremente conocida, o cuando se encuentran individuos de coloración atípica pertenecientes a especies bien conocidas.
7. Microhabitat de las especies encontradas, y notas sobre el comportamiento observado (como cortejo, poses defensivas, etc.).
8. Número de campo- Es útil llevar una serie de etiquetas numeradas en viajes al campo. Estas deben ser impresas en papel grueso (al que el alcohol y la formalina no puedan disolver) y con tinta permanente. También pueden hacerse etiquetas satisfactorias con aparatos marcadores de cinta plástica expendidos comercialmente; el hilo puede coserse directamente a las etiquetas, o amarrarse a una pequeña perforación hecha en un extremo, pero no debe quitarse el plástico adherido al reverso de la cinta. Evite usar hilo teñido, o hilo sintético (como nylon) ya que el líquido preservativo puede destruirlo. Puede usarse, satisfactoriamente, hilo grueso de algodón blanco, del usado para coser alfombras o zapatos. Después de hilvanar la etiqueta, amarre un nudo en el hilo (como se ilustra en la Fig. 1b). Cada espécimen debe tener su número propio, pues esto simplifica la tarea de asociar números y localidades. Contenido estomacal, gónadas, huevos, fotografías, grabaciones magnetofónicas, etc., deben llevar el mismo número del ejemplar, para así aumentar la eficacia de los análisis posteriores. Las etiquetas del campo deben amarrarse firmemente (con nudos "cuadrados") a los ejemplares, tal como se ilustra en las láminas 1 y 2. En lagartijas con poros femorales* la etiqueta debe amarrarse

* Los poros femorales se asemejan superficialmente a tubérculos, y generalmente son conspicuos; se encuentran formando una serie mas o menos lineal en la superficie ventral de los muslos de algunas especies de lagartijas.

bajo la rodilla para que el hilo no cubra uno o mas poros. Como veremos después, las etiquetas de campo deben numerarse independientemente de las del catálogo general.

De los datos citados los siguientes representan el mínimo necesario: 1 (localidad), 2 (fecha), 3 (nombre del colector o colectores) y 8 (número de campo). Al donar los ejemplares a una institución, los datos deben donarse también, pero no deben enviarse en el mismo recipiente de los ejemplares.

COMO MATAR LOS EJEMPLARES

Los ejemplares herpetológicos deben matarse de forma tal que queden con los músculos relajados. Después de muertos pueden fijarse, o endurecerse, en posiciones estereotipadas que permitan a los investigadores examinarlos facilmente y con la mayor precisión (ver láminas 1 y 2). Muchos libros recomiendan matar los reptiles con una inyección hipodérmica de pentobarbital (Nembutal o Dibutal) líquido en el corazón. Aunque esta técnica es en realidad excelente, el Nembutal es una droga difícil de conseguir. En Norteamérica el Federal Bureau of Narcotic and Dangerous Drugs vigila muy de cerca su expendio; en otros países puede obtenerse con receta médica o en casas de productos veterinarios. Aunque las personas capacitadas pueden obtener autorización para comprar Nembutal, la solicitud debe hacerse por lo menos varios meses antes de que se requiera. Para obtener detalles respecto al permiso necesario se aconseja al lector que consulte a representantes de la oficina citada, o a las agencias, Ministerios o Secretarías de Salud del país donde se desee comprar la droga.

El Nembutal se vende comercialmente en una concentración de 1 g/cc (verifique la etiqueta del frasco); evítese la forma de sirope o jarabe. Con reptiles grandes (de peso mayor de 5 libras) puede usarse el líquido concentrado; para reptiles menores puede diluirse al 1:5, o hasta al 1:10 para reptiles pequeños como Typhlops o Sphaerodactylus. Aunque esta última concentración puede también usarse con animales mayores, su muerte se prolonga demasiado y esto debe evitarse. Un cc (ml) de Nembutal concentrado, inyectado directamente en el corazón, generalmente basta para matar rapidamente un animal de tamaño o volumen semejante al de un Crotalus horridus (Cascabel) o un Bothrops atrox

(Nauyaca, Terciopelo, etc.). La posición del corazón puede determinarse observando cuidadosamente las escamas ventrales del tercio anterior del cuerpo donde podrá verse el latido del corazón (o inyecte en el vientre, donde puede ser absorbido por los intestinos pero la muerte ocurre mas lentamente). Otros reptiles pueden matarse inyectando Nembutal en la región cardíaca. No trate de inyectar animales tan pequeños o tan delgados que puedan ser muy dañados por las agujas disponibles.

Existen otras técnicas efectivas para matar reptiles. A las tortugas pueden encerrárseles en un recipiente hermético conteniendo un algodón o un trapo empapado de cloroformo, durante unos 15 a 30 minutos (Cook 1965). Debe cuidarse de que no se endurezcan al permanecer demasiado tiempo en la anestesia. El uso del cloroformo definitivamente no se recomienda para otros reptiles, pues al morir se contorsionan severamente; sin embargo, puede usarse, generalmente con buenos resultados en casi todos los reptiles, Tricloroetileno o éter en vez de cloroformo. Generalmente se necesita prolongar la anestesia por unos 5 minutos después de que ha caído el animal y no puede enderezarse sólo. El Tricloroetileno, o el éter, pueden obtenerse en casas comerciales de productos biológicos, e incluso en algunas farmacias, especialmente en Latinoamérica. El uso de estos anestésicos puede dar mejores resultados que el Nembutal con animales pequeños o frágiles, como gecos (o salamanquesas) tropicales. El éter es muy inflamable y puede explotar en ciertas condiciones, por lo que se debe usarse y almacenarse con especial cuidado. Lea cuidadosamente las instrucciones que lo acompañan.

Los anfibios, y algunos reptiles pequeños (como gecos tropicales), mueren poco después de ser sumergidos en una solución de Chloretone, (Clorobutanol Hidratado). Conviene preparar un concentrado de Chloretone, disuelto hasta saturación, en alcohol etílico (etanol) al 95%; el concentrado puede llevarse en pequeñas cantidades en un frasco pequeño y diluirse en el campo; 2 cc en 1/4 de litro de agua produce resultados efectivos. Mientras no se esté usando, la solución debe guardarse en un frasco hermético y puede volverse a usar muchas veces, aunque su potencia disminuye con el uso. si al fijar el animal éste se retuerce, lávelo y sumérjalo en el líquido por unos minutos adicionales.

Pueden también usarse otros métodos para matar anfibios y reptiles. Un método efectivo es colocarlos en un saco de tela y sumergirlo en agua

tibia (43-48° G), pero los animales deberán sacarse y fijarse inmediatamente despues de muertos. También pueden matarse sumergiéndolos en alcohol, de 15 a 25 % para anfibios y de 50 a 60 % para reptiles. Otro método, aunque no recomendable, es dejarlos en sacos de tela, o en frascos, expuestos al sol hasta que mueran por sobrecalentamiento, pero debe tenerse mucho cuidado, pues pueden rapidamente deshidratarse y esto los contorsiona y endurece. De todos modos, este método nunca debe usarse con anfibios.

Drogas como Hidrocloruro de Procaína (Livezey 1958) y Cloruro de Succinylcholine, o Anectine (Lambert 1967) pueden también usarse efectivamente para matar anfibios y reptiles pero, como el Nembutal, su expendio también se ha restringido.

Ciertas leyes recientes han restringido la disponibilidad de agujas y jeringas hipodérmicas (usadas para preservar anfibios y reptiles) en los Estados Unidos de Norteamérica. En la mayoría de los países latinoamericanos, sin embargo, se obtienen sin problema alguno. Las restricciones impuestas a las drogas mencionadas también pueden variar de estado a estado. Frecuentemente, sin embargo, es posible obtener el equipo necesario por medio de instituciones de investigación, especialmente si se solicita a cambio de ejemplares.

FIJACION

Para preservar la morfología y el color de los ejemplares, y/o para preparar sus tejidos para examen microscópico, estos deben fijarse. Por esto las sustancias fijadoras deben matar rapidamente los tejidos, penetrarlos uniforme y rapidamente, prevenir la distorsión y descomposición que puede ocurrir después de la muerte, y preparar los tejidos para que puedan luego teñirse. No existe un fijador que pueda hacer todo esto, por lo que deben hacerse ciertas concesiones de acuerdo con la finalidad específica de cada ejemplar. Los fijadores mas ampliamente aceptados para usarse en el campo son los siguientes:

- 1) Formalina, o Formol (Formalin en Inglés, das Formaldehyd en Alemán)- es el fijador mas aceptado en el campo. Se vende como una solución de gas formaldehído en agua, aproximadamente al 40%. Al diluirse, este porcentaje debe tomarse como el 100% y usarse, con buenos resultados, mezclando 1 volumen de formalina con 9 de

agua (o sea, al 10%). Para reducir la decoloración de los ejemplares y la decalcificación de los huesos (si los ejemplares han de permanecer mucho tiempo en este líquido) la formalina debe mezclarse con una cucharadita de bicarbonato de soda, borax o atíncar, por cada 1/4 de litro de formalina al 10%. Aunque mas frecuentemente la formalina se obtiene como un líquido, puede también conseguirse como un polímero pulverizado (paraformaldehído) que, por ser mas liviano y de volumen reducido, es más fácil de transportar. Huheey (1963) recomienda empacar 16 g de paraformaldehído y 4 g de carbonato de sodio anhidro (deshidratado); cada paquete puede disolverse luego, en el campo, en unos 400 cc de agua para así obtener formalina al 10%. El paraformaldehído puede obtenerse por medio de la Eastman Organic Chemicals (Rochester, New York) y, ya carbonatado, por medio de la Carolina Biological Supply House. La desventaja de la formalina es que es muy irritante a la piel, y sus vapores irritan las membranas mucosas, por lo que no es muy raro que quienes trabajan con ella desarrollen fuertes alergias; además, tiende a inflamar algunos tejidos en los ejemplares, haciéndolos inadecuados para ciertos exámenes histológicos.

- 2) FAA (Formalina-Alcohol-Ácido Acético)- Se prepara mezclando 10 partes de formalina comercial, 50 de alcohol (etílico o isopropílico) al 95%, 40 partes de agua y 2 de ácido acético glacial. El FAA penetra los tejidos mucho mejor que la formalina sola (por lo que es mejor para preservar especímenes encontrados muertos, o parcialmente descompuestos) y causa menos distorsión celular. Su principal desventaja es tener que mezclar varios compuestos, y la dificultad de conseguir alcohol y ácido acético en algunas localidades. El FAA no puede obtenerse pulverizado, pero para reducir su peso y volumen puede mezclarse sin agua y añadirse ésta después. En regiones muy cálidas es recomendable añadir el ácido acético poco antes de usar el FAA, pues aquel se evapora rapidamente. Para retardar eso pueden enfriarse los recipientes, envolviéndolos en trapos húmedos, y guardándolos en la sombra.
- 3) Alcohol- Si no es posible obtener la formalina o FAA, puede usarse alcohol para fijar los ejemplares. Cook (1965) recomienda alcohol

etílico (al 75% para anfibios y al 95% para reptiles) o isopropílico, pero este último no es aconsejable.

- 4) Fijadores especiales- Existe un gran número de fijadores especiales, cada uno para un cierto tipo de tejidos. La solución de Bouin (75 partes de ácido pícrico saturado en agua, 25 partes de formalina comercial y 5 de ácido acético glacial) es especialmente útil para preservar en el campo los testículos que habrán de usarse en estudios de espermatogénesis. En solución de Bouin, los testículos pueden guardarse por mucho tiempo sin distorsión celular, y el resto del animal puede guardarse en FAA o en formalina. Para una discusión detallada de fijadores especiales, consúltese la obra de Guyer (1961) o textos similares.
- 5) Misceláneos- Con ejemplares valiosos que es necesario preservar cuando no se tienen a mano los fijadores adecuados, pueden usarse ciertas medidas de emergencia. Pueden guardarse en salmuera fuerte, o congelarse, hasta obtener el fijador deseado. Generalmente no es adecuado usar licor, ya que el de 110 grados contiene apenas un máximo de 55% de etanol. Sin embargo, el tequila fuerte (de unos 160 grados) puede ser útil. Estas, sin embargo, son medidas desesperadas, ya que siempre es mejor preservar los ejemplares en un fijador adecuado (este puede conseguirse en hospitales, colegios locales, etc.).

Siempre es preferible introducir el fijador en la cavidad del cuerpo del animal ya que algunos (especialmente reptiles, y anfibios grandes) pueden descomponerse internamente si sólo se colocan en el fijador. Debe inyectarse suficiente líquido para llenar el animal, sin inflarlo. Debe cuidarse de no dañar los poros femorales de algunas lagartijas al pincharlos con la aguja. El cuello de las tortugas debe estirarse completamente y la boca ha de mantenerse abierta por medio de un corcho, un trozo de madera o un papel comprimido, hasta que se endurezca en esta posición. Puede colocarse la tortuga enganchando su mandíbula en un clavo o en una rama y dejar que su propio peso extienda el cuello antes de inyectar. En lagartijas o serpientes machos, un hemípenis*

* Los hemípenes son órganos copuladores pareados que se encuentran internamente en la base de la cola de lagartijas y serpientes. La palabra en singular es hemipenis (Latín) o hemipene (Español); La mayoría de los autores prefieren la voz latina.

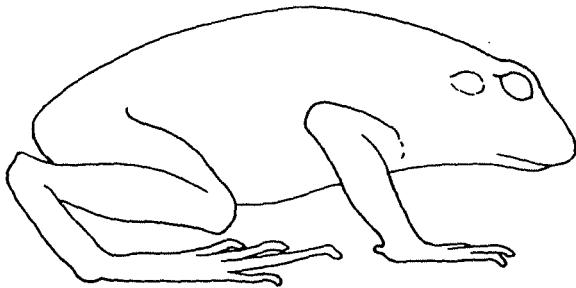
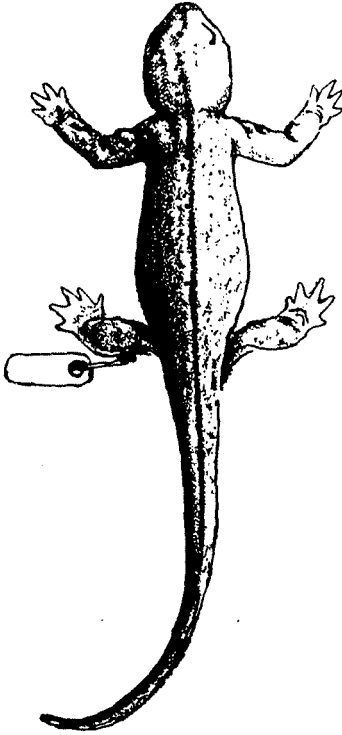
debe evertirse parcialmente, presionando con el dedo pulgar la base de la cola, y luego inyectando el mismo sitio para evertirlo completamente (ver la carátula); para evitar que el hemipenis pierda líquido y se contraiga parcialmente, conviene amarrar su base con un hilo. También puede evertirse sin presionar la base de la cola, con solo inyectar el fijador. En la lámina 2 se indican los sitios adecuados para estas inyecciones. En la cola de lagartijas y serpientes debe practicarse una larga incisión longitudinal, cuidando de no romper la cola, para que el fijador penetre mas rapidamente. Es necesario que los instrumentos de cortar estén siempre afilados. Para inyectar grandes cantidades de líquido puede usarse el aparato diseñado por Jackson (1971), pero nosotros no hemos tenido inconveniente al usar jeringas grandes. Si no es posible inyectar, deben practicarse incisiones profundas en varios lugares de la región ventral del ejemplar, y ampliar los bordes de éstas para que el líquido penetre mas facilmente. Siempre evite cortar la escama anal* de serpientes y lagartijas, y los poros femorales de las últimas.

Una vez que el animal ha sido inyectado o abierto conviene colocarlo en una posición adecuada entre dos capas de gasa o toallas de papel mojadas con fijador. Los recipientes mas adecuados para esto han de ser de fondo plano, de poca profundidad, y de material inoxidable (plástico, vidrio, metal esmaltado o inoxidable). Existen recipientes quirúrgicos, con tapa que se desliza, ideales para esto. Evite usar toallas de papel teñido, pues con frecuencia se decoloran en el fijador, manchando los ejemplares.

En las láminas 1 y 2 se ilustran las posiciones preferidas para fijar ejemplares y amarrar etiquetas. Anfisbénidos y gimnofionos (cecilios, suelda con sueltas) deben colocarse en la posición de las serpientes. Conviene fijar aquellos con la boca abierta para facilitar luego el examen de las características bucales. Para ahorrar espacio en los recipientes, la cola de algunas lagartijas debe doblarse. Las ranas y sapos pueden colocarse con la planta de la pata hacia abajo (Duellman 1962), pero esta posición ofusca muchos caracteres de la pata y/o de la región anal, por lo que muchos prefieren fijarlos en la posición ilustrada en la lámina 1. Los dedos siempre deberán quedar rectos y extendidos. No es necesario inyectar los anfibios pequeños antes de fijarlos, ya que el líquido penetra facilmente en la cavidad del cuerpo. La etiqueta de

* La última de las escamas ventrales (abdominales) agrandadas de las serpientes, cuya función es la de cubrir el ano (o cloaca). En lagartijas, la escama (o serie de escamas) inmediatamente anterior al ano.

Lámina 1. Anfibios



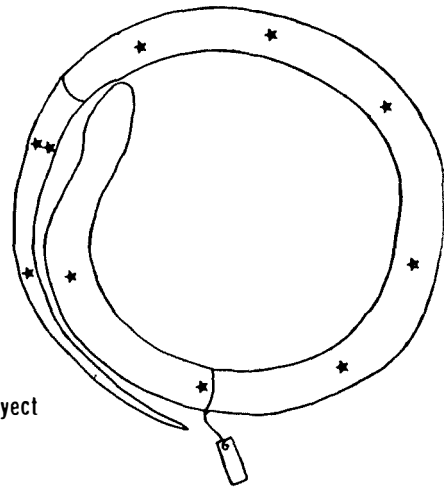
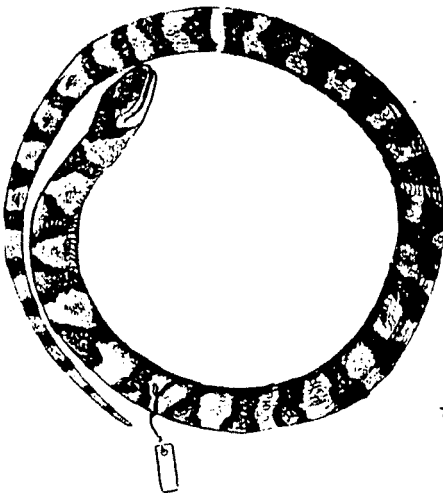
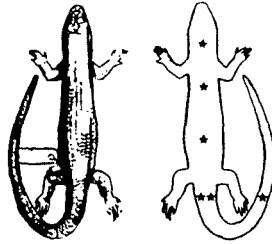
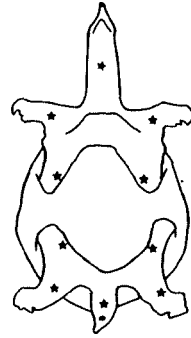
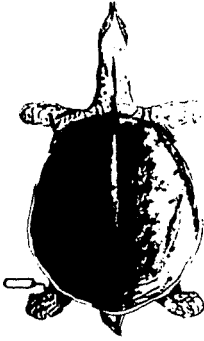
campo puede amarrarse en la cintura de anfibios o lagartijas muy pequeñas.

Los huevos y las larvas de anfibios se preservan mejor simplemente introduciéndolos en un frasco de formalina al 10%. Muchos anfibios adhieren sus huevos a hojas, ramas, etc. , y es preferible, si se puede, preservar también estos objetos, ya que los huevos pueden arruinarse al tratar de desprenderlos. Cambie la formalina original de huevos y larvas 12 horas después de fijados. Los huevos de los reptiles deben medirse (longitud y ancho, en milímetros) y luego inyectarse. Todos los especímenes deben permanecer en el fijador por 24 horas.

Con ejemplares grandes (demasiado grandes para guardarse enteros en líquido) puede hacerse lo siguiente:

- 1) Serpientes- Mida (en mm) la longitud de la cabeza y del cuerpo (longitud normal o estándar) y de la cola; quite la piel haciendo una larga incisión a un lado de la línea medioventral; deje la cabeza y la cola adheridas a la piel, inyéctelas con fijador e infle evirtiendo un hemípenis si el ejemplar es macho; corte el resto del cuerpo (evitando cortar la escama anal). En los boidos corte el cuerpo posteriormente un poco antes de los elementos óseos vestigiales de la pelvis. La piel ahora puede preservarse cubriendo la parte carnosa con tela o papel absorbente, enrollándola flojamente y sumergiéndola en fijador. También puede frotarse con borax o con jabón arsenicado, enrollarse y secarse, pero en este caso es mejor preservar la cabeza y la cola, separadamente, en líquido. Si el ejemplar es macho, presérvense también los testículos. Si es hembra anótese la condición reproductiva (número de huevos, tamaño de los mas grandes, etc.). Si se encuentran embriones, especialmente en formas poco conocidas, estos deben preservarse, y es mejor guardar todo el tracto reproductivo que sacar los embriones.
- 2) Tortugas- Evite cortar la concha (o caparazón). Es preferible cortar la cabeza, el cuello y los brazos juntos, como una sola unidad, la cola y los miembros posteriores como otra, y conservar ambas en líquido, junto con el estómago y los órganos reproductivos. La concha debe luego descarnarse y secarse cuidadosamente.
- 3) Cocodrilos, Lagartos, etc.- Mida y pele igual que las serpientes,

Lámina 2. Reptiles



★ = inject

pero pelando también la cola. No despegue ni pele las patas y las manos, pero inyéctelas con fijador. Conserve en fijador o frote la piel con borax o jabón arsenicado, y seque.

TRANSPORTE INTERNO

Una vez adecuadamente fijados, los ejemplares pueden, en su mayoría, ser transportados en bolsas plásticas, envueltos en gasa o en toallas de papel absorbente blanco empapadas con fijador, o con alcohol (etílico al 70% o isopropílico al 40%). Pueden envolverse muchos ejemplares pequeños en una sola toalla o tira de gasa, poniendo ésta sobre una superficie plana, espaciando sobre ella los especímenes, doblando los bordes sobre éstos y enrollándola, flojamente, como una alfombra. Puede también usarse algodón, en vez de gasa o toallas, pero es incómodo por ser grueso y porque, aún mojado, se adhiere a los especímenes, especialmente a los de escamas ásperas. La bolsa plástica debe cerrarse, ya sea anudando un extremo, o amarrándolo con una tira de hule o goma; luego debe introducirse en otra bolsa, y cerrarla igualmente. Es conveniente, por razones de volumen, sacar el aire de las bolsas; también conviene asegurarse de que éstas no tengan perforaciones o fugas.

Así empacados, los ejemplares ocupan muy poco espacio, son livianos (dos factores importantes para su transporte) y pueden durar varias semanas en buen estado, mientras el líquido no se escape. Las bolsas deben colocarse en recipientes firmes (ponga las mas pesadas bajo las mas livianas) y, como estos serán luego sujetos a cierto maltrato, vale la pena asegurarse de que el daño a los ejemplares será mínimo, por lo que las bolsas deben acolchonarse con estopa, algodón, trapos, papel arrugado, etc. Los recipientes deben ser resistentes, y variar según el volumen contenido. Latas vacías de pintura pueden conseguirse en muchos tamaños, son sólidas, livianas, y practicamente herméticas. Quite las asas, si las tienen, antes de usarse. También pueden usarse cajas de cartón fuerte, cilindros hechos especialmente para este fin e incluso (cuando su volumen es grande), cajas de madera.

En general, debe evitarse mandar ejemplares en frascos de vidrio, excepto para huevos, larvas y ejemplares muy frágiles. Estos deberán colocarse en los recipientes mas pequeños que puedan contener los ejemplares y suficiente líquido; los recipientes pueden ser pequeños frascos, de vidrio o de plástico,

cuya tapa cierre herméticamente. Si estos no pueden obtenerse (en casas de productos biológicos o en farmacias) es posible obtener una lista de distribuidores locales a través de las farmacias grandes de hospitales. Si se tienen, pueden usarse tubos rígidos de plástico, cortándose del tamaño adecuado y sellando herméticamente los extremos con tapas hechas para este fin. En cualquier caso las tapas deben asegurarse amarrándolas con alambre delgado o sellándolas con cinta adhesiva, y los recipientes deben acolchonarse en forma tal que no se dañen.

Ejemplares grandes, como tortugas y lagartos, deben empacarse con cuidado especial, preferentemente en cajas de madera, y enviarse como carga, en tren, avión, o líneas locales de transporte.

Si los ejemplares se enviarán por correo o algún otro tipo de servicio postal, es conveniente averiguar cuales son las restricciones de tamaño, peso, etc., antes de empacar.

Puede ser necesario, e incluso estéticamente conveniente, envolver los recipientes (o las cajas de cartón, si no son muy grandes) con papel grueso, y amarrarlos firmemente con un cordón, sogá, mecate o cabuya. Finalmente, deben etiquetarse. Las etiquetas deben escribirse con letra de molde y tinta indeleble, y prepararse en 3 copias. Una de ellas debe ir dentro del recipiente, junto con las bolsas. Otra debe pegarse al recipiente, y la tercera debe pegarse sobre el papel que lo envuelve. En los dos últimos casos, asegúrese de que no se despegarán en el trayecto. En las etiquetas debe escribirse claramente el nombre del destinatario y "EJEMPLARES CIENTÍFICOS PRESERVADOS".

TRANSPORTE INTERNACIONAL

En el pasado reciente (y en algunos casos en el presente) se acostumbraba donar los ejemplares colectados a los grandes museos de América y Europa, donde existen numerosos investigadores capaces de estudiarlos e identificarlos. Actualmente, con el aumento de instituciones e investigadores Latinoamericanos, la tendencia de enviar los ejemplares al extranjero es cada vez menor, e incluso muchos los guardan tan celosamente que no los prestan ni a sus colegas vecinos. Donar los ejemplares a museos o instituciones extranjeras tiene la desventaja de reducir a los investigadores locales a sólo meros coleccionistas, y esto es injusto. Por otra parte, enviarlos no a uno sino a varios museos geográficamente

distantes, una vez han sido estudiados, tiene la doble ventaja de hacerlos mas asequibles a otros investigadores y de asegurar de que al menos parte de la colección sobrevivirá accidentes humanos (guerras, bombardeos, o hasta disminución de interés en cuidar la colección) y catástrofes naturales (terremotos, inundaciones, etc.). Incontables ejemplares valiosos se han perdido definitivamente por esto.

Donar los ejemplares a instituciones extranjeras es una decisión que los coleccionistas deben considerar seriamente. Por otra parte, el préstamo o intercambio de ejemplares siempre es beneficioso a ambas partes y facilita el desarrollo de la herpetología, independientemente de nacionalidad o localización geográfica. Los métodos de empacar los ejemplares para enviarlos a otros países son esencialmente idénticos a los descritos en la sección precedente, aunque la forma de envío puede variar de un país al otro.

Generalmente, el correo es la forma mas conveniente de enviarlos, especialmente si van en paquetes de poco volumen o peso. Puesto que el correo ordinario puede prolongar el trayecto hasta 3 o 4 meses, es prudente enviarlos por correo aéreo, o asegurarse de que llevan suficiente líquido. También es conveniente certificar los paquetes. Consulte a la oficina postal local cuál es el peso máximo permitido para cada paquete. Si el envío es muy voluminoso puede mandarse por carga, en avión o ferrocarril. En este caso el envío cae bajo la categoría de "importación-exportación", por lo que el contenido debe manifestarse (consulte las aerolíneas o transportes locales) y, para evitar el cobro innecesario de impuestos, los paquetes y el manifiesto (o declaración) deben claramente marcarse SIN VALOR COMERCIAL. Antes de efectuar el envío conviene consultar al Ministerio o a la Secretaría de Comercio sobre las características del envío.

En muchos países la conciencia conservacionista ha comenzado a influir en las leyes, por lo que severamente restringen la entrada y salida de animales, vivos o muertos. Antes de aventurarse a coleccionar en otro país, debe consultarse a la oficina local de Agricultura y Ganadería, de Vida Silvestre, de conservación, etc., según sea el caso, para obtener el permiso adecuado. En norteamérica las restricciones principales incluyen cocodrilos y algunas tortugas, pero las especies protegidas varían de país a país. Generalmente las restricciones son menores si el envío se hace con el carácter de préstamo o de intercambio. Conviene incluir en el manifiesto una lista completa de las

especies enviadas, para que los oficiales verifiquen si no están entre las especies "en peligro" y si es posible o no su envío.

Otro problema de gran importancia es el del registro o la inspección de los paquetes. Legalmente, el país de origen, y el de destino, tienen derecho a inspeccionar el contenido de los paquetes, pero hasta hace poco esto era raro en las oficinas postales. Actualmente, como una medida para contrarrestar el tráfico de drogas, narcóticos y estupefacientes, muchos países rutinariamente los inspeccionan. Puesto que el contenido de las bolsas no es visible, y generalmente es sospechoso, los inspectores las abren (a veces hay que cortarlas) y, por ignorancia, las cierran inadecuadamente; el fijador se escapa y los ejemplares se deshidratan, con frecuencia arruinándose irreparablemente. Para evitar esto, muchos museos han comenzado a incluir dos copias de una nota, bilingüe si es necesario, con el siguiente mensaje:

INSPECTOR POSTAL: Este paquete contiene ejemplares de anfibios y/o reptiles, muertos y preservados en fijador, empacados en bolsas de plástico. Puesto que los ejemplares son de valor científico y se arruinan si no permanecen en su líquido preservativo, se suplica que, después de abrir las bolsas, las cierre herméticamente para evitar que el líquido se evapore o derrame. Gracias.

ÀS AUTORIDADES ALSANDEGARIAS: Este volume contem anfíbios e répteis mortos, conservados em sacos plásticos. Como o conteúdo tem valor científico e se estragará se não for mantido húmido no preservativo, pedese que após abrir os sacos para inspeção os mesmos sejam firmemente fechados para evitar evaporação ou derramamento do líquido. Obrigado.

INSPECTION OFFICER: This package contains dead, preserved specimens of amphibians and/or reptiles, packed in plastic bags. As the specimens are scientifically valuable and they will be ruined if they are not kept moist in their preservative it is imperative that after opening the bags for inspection they are tightly sealed to avoid evaporation or spillage of the liquid. Thank you.

Una copia de este mensaje debe pegarse al exterior del paquete, y la otra debe introducirse junto con las bolsas de ejemplares de modo que sea visible al abrir el paquete. Generalmente da buenos resultados.

ALMACENAMIENTO

Esta sección no está destinada a ser una guía completa de las técnicas curatoriales sino, mas bien, para servir como una serie de direcciones resumidas para quienes deseen comenzar una colección de anfibios y reptiles preservados. Para una discusión mas detallada, consúltese la obra de Slevin (1927).

Las colecciones preservadas se mantienen mejor en alcohol. El alcohol adecuado puede costar, por galón, aproximadamente lo mismo que la formalina (aunque tiende a ser mas caro en muchos países), y es mas conveniente examinar ejemplares conservados en alcohol. Debido al alto impuesto fiscal que lleva el alcohol etílico, muchos prefieren no usarlo. El isopropílico es mucho mas barato y es completamente satisfactorio para guardar ejemplares (aunque no es aconsejable para fijarlos). Nunca use metílico. El etílico y el isopropílico generalmente se venden concentrados al 95%; 526 cc de éste, y 474 cc de agua, producen un litro de alcohol al 40%. Al transferir los ejemplares de la formalina o de FAA al alcohol deben primero ponerse en agua durante 48 horas; de otra forma el alcohol con frecuencia los deshidratará. Si se desea usar el material para examen histológico, las porciones del tejido necesario deben permanecer en alcohol al 30% durante 24 horas, y por otras 24 horas en alcohol de 50%. En este caso evite las 48 horas en agua. No apiñe demasiados ejemplares en cada frasco. Las serpientes fijadas en la posición antes ilustrada facilmente se enrollarán en los frascos de almacenamiento.

A cada espécimen de la colección debe asignársele un número de catálogo, además del ya mencionado número de campo. Los huevos de anfibios y reptiles, y las larvas de aquellos, deben catalogarse con una sola etiqueta que designe el lote. Cada número debe entrarse en el catálogo permanente (usando tinta indeleble), junto con el nombre de la especie, sexo, localidad, fecha de captura y/o de preservación (si ambas son diferentes), notas ecológicas, nombre de el o los coleccionistas, y número de la etiqueta de campo. Las etiquetas deben amarrarse en la misma región de las de campo. Es conveniente mantener un fichero ordenado por familias taxonómicas donde cada especie tenga su propia tarjeta, y en la que se incluya el número (y localidad, si se desea) de cada uno de los ejemplares de esa especie.

Conviene preparar una etiqueta con el nombre de cada especie, y colocarla en cada uno de los recipientes. Estas deben escribirse con tinta indeleble y

ser de papel grueso y durable, que el preservativo no disuelva. El papel producido en norteamérica por Byron-Weston Mills con el nombre de "Linen Record Ledger" (100% fibra de algodón y lino; peso 36 lbs.) y por Dennison Paper Co. con el nombre de "Resistall Index Bristol" (100% de tela(rag); peso 110 lbs.) es excelente y puede obtenerse en muchas imprentas. Si en su país no puede obtenerse, consulte en una imprenta cuáles productos accesibles son comparables a estos. Obtenga (si es posible) unas muestras de antemano e introdúzcalas en el fijador por una o dos semanas para asegurarse de que no se desbaratan. Esto no es necesario si se prefiere colocar estas etiquetas en el exterior de los recipientes. La etiqueta puede colocarse dentro de los recipientes transparentes, o pegarse con cinta adhesiva al exterior de los opacos. En la figura 2 se ilustra una etiqueta típica de museo.

Los frascos o recipientes con ejemplares deben guardarse en sitios frescos, para retardar la evaporación del preservativo, y nunca deben exponerse a la luz solar directa, pues los ejemplares se decoloran rápidamente. Para reducir la evaporación pueden también colocarse sobre la boca de los frascos, antes de taparlos, un lámina de Parafilm (puede obtenerse en Carolina Biological Supply House, Burlington, North Carolina), o papel encerado si no puede obtenerse Parafilm. Los recipientes deben inspeccionarse periódicamente y debe mantenerse el nivel del líquido. Las colecciones bien hechas y bien cuidadas son valiosos instrumentos de investigación y docencia.

PRESERVACION DEL COLOR

Aunque preservar el estado morfológico de los ejemplares nunca ha presentado mayores obstáculos a los coleccionistas, conservar su color es otra historia. Todos los líquidos usados comunmente son alcohólicos y/o acídicos en cierto grado, por lo que generalmente en poco tiempo disuelven y extraen la mayoría de los pigmentos. Los anfibios son especialmente vulnerables a esto, aunque en los reptiles el efecto es también notable.

Hasta hace poco el único método aceptable para preservar el color de la piel de los anfibios era el descrito por Cooke (1965). Basicamente, éste consiste en pelar el ejemplar, confinando todas las incisiones a las superficies ventrales del cuerpo y de los miembros; la piel se hace flotar, con la cara carnososa hacia arriba, en un plato o en una bandeja con agua, donde se quita el resto

FIG. 2

MUSEUM OF NATURAL HISTORY

Lampropeltis triangulum elapsoides

SPECIES

KENTUCKY

CAT. NO.	LOCALITY
140005	Floyd Co. Madin
140199	McCreary Co. near Cumberland Falls
140300	Whitley Co. Cumberland Falls
151004	Edmonson Co. near Mammoth Cave National Park

de los tejidos. La piel luego se hace flotar extendida, esta vez con la cara carnosa hacia abajo, en otro recipiente; se introduce un trozo de cartón húmedo bajo la piel estirada y se levanta, alisando la piel frotándola levemente, para aplanarla y quitar el agua o aire que pueda haber quedado atrapado entre el cartón y la piel. Esto luego se deja sobre un papel secante o poroso hasta quedar apenas húmedo, y luego se coloca entre 2 pliegos de papel secante y se prensa con objetos pesados (como libros) hasta quedar completamente seca. También puede usarse una prensa botánica. La piel de los reptiles puede preservarse igualmente. El resto del cuerpo debe preservarse en líquido y etiquetarse con el mismo número que la piel. La piel, así preparada, debe guardarse en la obscuridad y no debe exponerse a la luz por mucho tiempo.

Esta técnica, aunque es útil, es tediosa. Windsor (1971) describió otra, usando como fijador una solución líquida 50% saturada de sulfato de amonio. Como la solución es una sal neutra, el pigmento no se disuelve, y el color era aún evidente en las ranas aún 6 meses después de preparadas. Este proceso toma por lo menos 36 horas.

Estos especímenes pueden guardarse en formalina carbonatada (al 10%) o en alcohol isopropílico (al 40%), al que se añade Ionol-40 líquido (White & Peters 1969). No debe usarse Ionol en polvo, pues es difícil preparar un compuesto estable disuelto en el preservativo. El Ionol puede obtenerse en Shell Oil Co. (Chemical Division). El método de Formalina/Ionol ha sido exitosamente usado, con ejemplares herpetológicos, por el Sr. Woodrow Barber, Departamento de Biología, University of Kentucky al Morehead, y el Dr. George Iannarone, Chicago Academy of Sciences (Comunicación Personal).

Aunque los métodos descritos no se han usado en gran escala con material herpetológico, el éxito que han tenido es menor escala, junto con el valor que tendría la preservación exacta del color, sugieren que deben ser investigados concienzudamente.

REFERENCIAS

- Cook, Francis R. 1965. Collecting and preserving amphibians and reptiles. pp. 128-151 In R. M. Anderson (ed). Methods of collecting and preserving vertebrate animals. Nat. Mus. Canada, Bull. No. 69, Biol. Ser. No. 18; 199 pp.
- Duellman, William E. 1962. Directions for preserving amphibians and reptiles. pp. 37-40 In E. Raymond Hall (ed). Collecting and preparing study specimens of vertebrates. Misc. Publ. Univ. Kansas Mus. Nat. Hist. No. 30; 46 pp.
- Guyer, Michael F. 1961. Animal micrology, 5th impression. Univ. Chicago Press, Ill.; XVlll + 327 pp.
- Huheey, James E. 1963. Concerning the use of paraformaldehyde as a field preservative. Copeia 1963(1):192-193.
- Jackson, Morris K. 1971. A new "syringe" for injecting herptiles. Herpetol. Rev. 3(4):75.
- Lambert, Lewis H., Jr. 1967. 'Anectine': a herpetological killing agent. Herpetologica 23(2):135-136.
- Livezey, Robert L. 1958. Procaine hydrochloride as a killing agent for reptiles and amphibians. Herpetologica 13(4):280.
- Slevin, Joseph R. 1927. The making of a scientific collection of reptiles and amphibians. Proc. Calif. Acad. Sci. 16(9):231-259.
- White, David A. and Edward J. Peters. 1969. A method of preserving color in aquatic vertebrates and invertebrates. Turtlox News 47(9):296-297.
- Windsor, Donald A. 1971. Ammonium sulfate as a preservative which does not remove color from frogs. Copeia 1971(2):356-357.

INDICE

- Acido Acético (ver FAA) 8,9
 Pícrico (ver Solución de Bouin) 9
 Agricultura & Ganadería, Ministerio (Oficina) de 16
 Alcohol, etílico 6,8,9,14
 isopropílico 8,14,18,20
 metílico 18
 Altimetro 2
 American Highway Atlas 2
 Amonio, Sulfato de 20
 Anectine 7
 Anfíbios (ver también nombres específicos) 6,11
 Anfisbenidos 10
 Arsenicado, jabón 12
 Atlas 2
Bothrops atrox 5
 Bouin, Solución de 9
 Byron-Weston Mills 19
 Carbonato de Sodio 8
 Carolina Biological Supply House 19
 Cascabel (Crotalus) 5
 Chloretone (ver Clorobutanol Hidratado) 6
 Clorobutanol Hidratado 6
 Cloroformo 6
 Cloruro de Succinylcholine 7
 Cocodrilos 12-14
 Conservación 1
 Oficina (Ministerio) de 16
 Correo aéreo 15,16
 certificado 16
 ordinario 16
Crotalus horridus 5
 Dennison Paper Co. 19
 Dibital (ver Pantobarbital Sódico) 5
 Drogas 5-7
 Eastman Organic Chemicals 8
 Ejemplares (ver especímenes)
 Embriones 12
 Especímenes, almacenamiento 18
 color 7, 19-20
 datos de los 2-5
 donación de 15-16
 empaqué de 14
 fijación de 7
 intercambio de 16
 muerte de los 5
 muy grandes 12,15
 transporte de 14-17
 Eter 6
 Etiquetas, de campo 4
 de catálogo 18
 de paquete 15
 de plástico 4
 de recipiente 18-19
 FAA (Formalina-Alcohol-Acido Acético) 8
 Ferrocarril 16
 Fijadores especiales 9
 Formaldehído (ver Formalina)
 Formaldehyd (das) (ver Formalina)
 Formalina 7-8,12,18,20
 Formol (ver Formalina)
 Geodésicos, Servicios 2
 Gimnofionos 10
 Gousha Co. 2
 Hemipenis, eversión de los, carátula 10
 Hidrocloruro de Procaína 7

- Huevos 12
 Impuesto, innecesario 16
 sobre el etílico 18
 Inspección Postal 17
 Institutos Geográficos 2
 Intercambio de ejemplares 16
 Introducción 1
 Inyección, aparato de 10
 sitios de 9,13
 Ionol-40 20
 Isopropílico, alcohol 8,14,18,20
 Jabón, arsenicado 12
 Lagartos 12-14
 Larvas 12
 Linen Record Ledger 19
 Licor 9
 Mapas 2
 Ministerio de Agricultura y Ganadería 16
 Comercio 16
 Conservación 16
 Salud 4
 Narcóticos, regulación de 5
 Nauyaca 6
 Nembutal (Pentobarbital Sódico) 5,6,7
 Odómetro 2
 Oficina de Agricultura y Ganadería 16
 Comercio 16
 Conservación
 Salud 4
 Postal 16
 Pentobarbital Sódico 5
 Parafilm 19
 Paraformaldehído 8
 Pelikan 2
 Poros femorales 4,9,10
 Préstamo de ejemplares 16
 Procaína, Hidrocloruro de 7
 Resistall Index Bristol 19
 Salmuera 9
 Salud, Ministerio (Oficina o
 Secretaría) de 4
 Shell Oil Co. 20
 Silvestre, Oficina (Ministerio) de
 Vida 16
 Sódico, Pentobarbital 5-7
 Sodio, Carbonato de 8
 Solución de Bouin 9
Sphaerodactylus 5
 Succinylcholine, Cloruro de 7
 Sulfato de Amonio 20
 Tequila 9
 Terciopelo 5
 Testículos 9,12
 Tinta indeleble 2
 Topográfico, Mapa 2
 Transporte Internacional 15
 Local 14
 Tricloroetileno 6
 Tortugas 12
Typhlops 5
 U.S. Geological Survey 2
 Vida Silvestre, Oficina (Ministerio)
 de 16

individuos en cualquier parte del mundo; subscripciones institucionales US \$ 16.00. Dirigirse al Secretario de la Sociedad, Dr. Max A. Nickerson, Vertebrate Division, Milwaukee Public Museum, Milwaukee, Wisconsin 53223 (U.S.A.).

© 1974 Society for the Study of Amphibians and Reptiles.
Derechos Reservados.

Impreso en U.S.A.
Printed in U.S.A.

HERPETOLOGICAL CIRCULARS

A Guide to Preservation Techniques for Amphibians and Reptiles by George R. Pisani. Pp. 1-22. July 1973.

Guia de Tecnicas de Preservacion de Anfibios y Reptiles por George R. Pisani y Jaime Villa. Pp. 1-28. April 1974.